

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Juni 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/051275 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/543**, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003938

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. November 2003 (28.11.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 102 56 415.9 2. Dezember 2002 (02.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

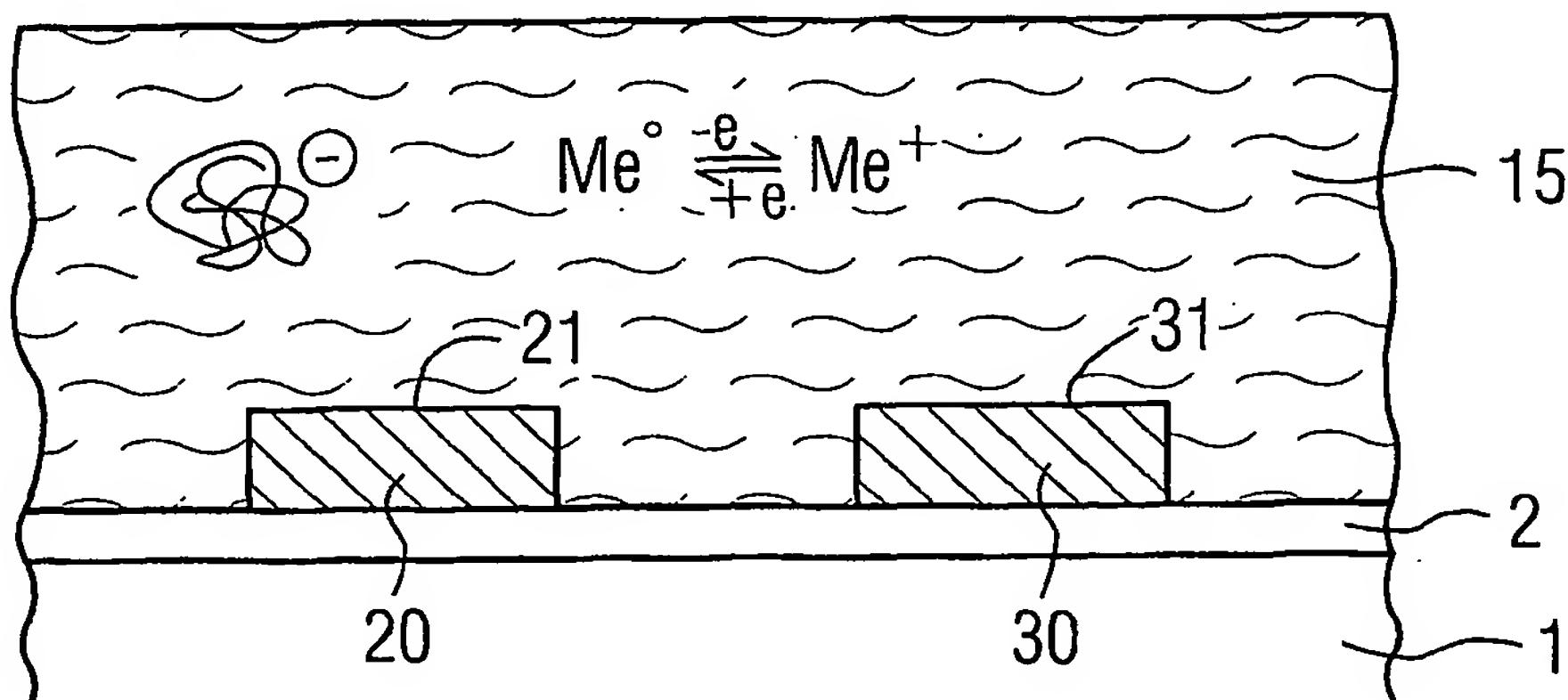
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BARLAG, Heike** [DE/DE]; Äussere Laufer Gasse 10, 90403 Nürnberg (DE). **GUMBRECHT, Walter** [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzogenaurach (DE). **STANZEL, Manfred** [DE/DE]; Taunusstrasse 100, 91056 Erlangen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TRANSPORTING OR BINDING-SPECIFIC SEPARATION OF ELECTRICALLY CHARGED MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM TRANSPORT BZW. ZUR BINDUNGSSPEZIFISCHEN TRENNUNG ELEKTRISCH GELADENER MOLEKÜLE



(57) Abstract: Electrically charged molecules need to be transported in order to create a DNA sensor. According to the invention, the following measures are undertaken: base metals are introduced into a solution as a positive ion; negatively charged molecules are transported in an opposite direction and are enriched in the vicinity of the measuring electrodes. Binding-specific separation of the charged molecules can be achieved by forming metal layers on the measuring electrodes by depositing metal ions from the solution when a suitable potential is selected. Target DNA can more particularly be introduced into the vicinity of catcher molecules on the measuring electrodes and non-specifically bound DNA can be removed. According to the associated device, the electrode arrangement (20,30) is associated with a sacrificial electrode (40) made of a more base metal than the material of the measuring electrodes (20,30). The measuring electrodes (20,30) in particular are made of noble metal, preferably gold, and the sacrificial electrode (40) is made of copper.

(57) Zusammenfassung: Zur Schaffung eines DNA-Sensors müssen elektrisch geladene Moleküle transportiert werden. Gemäß der Erfindung erfolgen folgende Massnahmen: Es werden unedle Metalle als positives Ion in Lösung gebracht, wodurch negativ geladene Moleküle in die entgegengesetzte Richtung transportiert und in der Nähe der Messelektroden angereichert werden. Durch Ausbildung von Metallschichten auf

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

---

den Messelektroden durch Anlagern der Metallionen aus der Lösung lässt sich bei Vorgabe eines geeigneten Potenzials eine bindungsspezifische Trennung der geladenen Moleküle erreichen. Insbesondere können somit Ziel-DNA in die Nähe von Fänger-Molekülen an den Messelektroden gebracht und auch unspezifisch gebundene DNA entfernt werden. Bei der zugehörigen Vorrichtung ist der Elektrodenanordnung (20, 30) eine Opferanode (40) aus unedlerem Metall als das Material der Messelektroden (20, 30) zugeordnet. Die Messelektroden (20, 30) bestehen insbesondere aus Edelmetall, vorzugsweise Gold, und die Opferanode (40) aus Kupfer.

## Beschreibung

Verfahren und Vorrichtung zum Transport bzw. zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle

5

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Transport bzw. zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen 10 zwei Messelektroden. Daneben bezieht sich die Erfindung auf die zugehörigen Vorrichtungen.

Bei zahlreichen Verfahren der Molekularbiologie spielt der 15 Transport von geladenen Teilchen im elektrischen Feld (Migration) eine wichtige Rolle. Die Wanderungsgeschwindigkeit v der geladenen Teilchen im flüssigen Medium ist dabei proportional der Feldstärke E und der Ionenladung Q und umgekehrt proportional dem Teilchenradius r und der Viskosität  $\eta$  der 20 Suspension. Es ergibt sich für die Geschwindigkeit v:

$$v = QE/6\pi r\eta \quad (1)$$

Bei der Elektrophorese z.B. werden Biomoleküle, d.h. vor allem Proteine und DNA, die sich bezüglich ihrer Größe und/ 25 oder Ladung unterscheiden, voneinander getrennt. Die Anwesenheit von anderen beweglichen, geladenen Teilchen ist bei bestimmten Formen der elektrophoretischen Trennung (z.B. isoelektrische Fokussierung) zu vermeiden, da sonst der Ladungstransport teilweise oder ganz von diesen und nicht von den zu 30 trennenden Molekülen übernommen wird. Als Puffer werden daher oft Aminosäuren verwendet, die ihren isoelektrischen Punkt beim gewünschten pH-Wert haben. Das heißt, beim eingestellten pH-Wert haben die Puffermoleküle selbst keine Nettoladung und unterliegen daher nicht der Migration.

Auch beim Transport von geladenen Molekülen, z.B. um die Konzentration an einem bestimmten Ort zu erhöhen oder zu erniedrigen, werden elektrische Felder eingesetzt. Insbesondere bei Mikrosensoren, z.B. zur DNA-Analyse, kann die Empfindlichkeit gesteigert werden, wenn die zu detektierenden DNA-Fragmente (Zielmoleküle) am Ort der Fänger-Moleküle (Sensoroberfläche) konzentriert werden. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz steigt damit die Zahl der Fänger-/Zielmolekülbindungen. In jedem Fall werden bei einer solchen Reaktion aber nicht nur Fänger-/Zielmolekülpaares gebildet, die exakt zueinander passen, sondern auch solche, deren Sequenz an einigen Stellen nicht exakt miteinander korrespondieren (Mismatches).

Da die Größe der Bindungsenergie mit der Zahl der nicht korrespondierenden Basen abnimmt, können durch die Anwendung entsprechender Kräfte selektiv solche Bindungen wieder getrennt werden, die eine bestimmte Zahl von Mismatches besitzen (Stringenzbehandlung). Als Kraft kann hier ein elektrisches Feld wirksam werden, das im Gegensatz zum ersten Prozess, dem Konzentrieren der Moleküle, eine entgegengesetzte Polarität aufweist.

Voraussetzung für den Transport von geladenen Teilchen im elektrischen Feld ist ein Feldgradient, der innerhalb des Elektrolyten bzw. der Transportstrecke, streng monoton verläuft. Das heißt, der Feldgradient darf sein Vorzeichen nicht ändern und nicht zu Null werden. Das Anlegen einer beliebigen Spannung ist dazu für wässrige Systeme nicht zwangsläufig ausreichend. In Abwesenheit einer chemischen Reaktion vor den Elektroden fällt die Spannung über die elektrochemische Doppelschicht ab und der Feldgradient zwischen den Elektroden wird zu Null. Wenn allerdings eine Reduktions- bzw. Oxidationsreaktion an den Elektroden stattfindet, wird die Doppelschicht vor den Elektroden depolarisiert und das elektrische Feld verläuft streng monoton innerhalb des Elektrolyten. Ein Ionentransport im wässrigen Elektrolyten ist die Folge.

Ein häufig angewendetes Verfahren zur Erzeugung solcher elektrischer Felder in wässrigen Systemen ist das Anlegen der Zersetzungsspannung von Wasser. Dabei wird an der Anode Sauerstoff und an der Kathode Wasserstoff entwickelt. Bei der 5 experimentellen Durchführung muss darauf geachtet werden, dass die Gase und insbesondere ihre radikalischen Vorstufen nicht mit den zu untersuchenden Molekülen in Kontakt kommen, da diese sonst chemisch verändert würden. In makroskopischen Systemen geschieht dies durch Trennung der Elektrolyträume 10 direkt vor den Elektroden vom Elektrolytraum zwischen den Elektroden, z.B. durch Diaphragmen. Für Mikrosensoren ist diese Lösung problematisch, da Diaphragmen nicht praktikabel sind.

15 Eine Möglichkeit zur Elektrophorese in Mikrosystemen besteht darin, dass sogenannte Permeationslayer aus hydrophilem Polymer vor den Elektroden eingeführt werden, wozu auf die US 5 605 662 A verwiesen wird. Die Beweglichkeit von Reaktionsprodukten der Wasserelektrolyse und der zu transportierenden 20 DNA ist in dieser Schicht stark gehemmt, so dass eine Durchmischung quasi nicht stattfindet. Der Ladungstransport im Permeationslayer wird von kleineren Ionen übernommen.

Obwohl das bekannte Verfahren praktikabel ist, wird durch die 25 Einführung neuer Polymer-Schichten die Herstellung des Mikrosensorschips deutlich aufwändiger und damit teurer.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein geeignetes Verfahren zum Transport der geladenen Moleküle mittels eines elektrischen Feldes anzugeben, bei denen an der Elektrode keine Wasserstoff- bzw. Sauerstoffentwicklung eintritt. Insbesondere soll unter Ausnutzung des Elektrophoreseverfahrens eine entsprechende Vorrichtung geschaffen werden, welche mit Standard-Materialien und Schichten der Chipherstellung auskommen.

35 Die Aufgabe ist bezüglich des Verfahrens durch die Merkmale alternativ des Patentanspruches 1 oder des Patentanspruches

12 gelöst. Eine zugehörige Vorrichtung ist im Patentanspruch 15 angegeben. Weiterbildungen des Verfahrens bzw. der Vorrichtung sind Gegenstand der jeweils abhängigen Ansprüche.

5 Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung können mit einem prinzipiell gleichen Aufbau fakultativ das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Patentanspruch 1 oder das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Patentanspruch 12 ausgeführt werden. Dabei ist es auch vorteilhafterweise möglich, beide Verfahren miteinander zu kombinieren, beispielsweise zyklisch.  
10

Die Erfindung macht sich bei der Anwendung des Elektrophoreseverfahrens zunutze, dass zur Erzeugung des elektrischen Feldes in der Analytlösung außer der Elektrolyse von Wasser 15 auch andere Reaktionen eingesetzt werden können. Gemäß der Erfindung wird ein Metall/Metallionenkomplex, z.B. Kupfer/Kupferhistidinkomplex, als Depolarisator vor den Elektroden vorgeschlagen. Bei positiver Polarisierung einer mit Kupfer 20 beschichteten Elektrode zwecks Aufkonzentrierung negativ geladener Ionen wird dann nicht Sauerstoff entwickelt, statt dessen geht das Kupfer als Ion in Lösung. Ist dort ein Komplexbildner für das Metall, z.B. Histidin für Kupfer, vorhanden, so bleibt das Metallion stabil in Lösung. Da z.B. der Kupfer-Histidin-Komplex sehr stabil ist, bleibt die Konzentration 25 der freien Kupferionen sehr klein und nahezu konstant. Ein Einfluss der Kupferionen auf die DNA-Hybridisierung wird dadurch vermieden.

Soll die Elektrode negativ polarisiert werden, um z.B. die 30 Selektivität der Fänger-/Zielmolekülbindung zu erhöhen (Stringenzbehandlung), d.h. unspezifisch gebundene, nicht-komplementäre Proben-DNA von der Fänger-DNA zu entfernen, werden bei Anwesenheit eines Metallionenkomplexes eines hinreichend edlen Metalls, z.B. Kupfer, die Metallionen reduziert 35 und dabei auf den Elektroden (in diesem Fall den Mess-Elektroden) abgeschieden. Eine Wasserstoffentwicklung wird dadurch vermieden. Der Komplexbildner für das Metallion kann

u.U. auch gleichzeitig als Puffer dienen. Histidin wird beispielweise als Puffer bei pH = 7 eingesetzt. Das auf den Mess-Elektroden abgeschiedene Kupfer kann in einem Wasch-

5 Schritt durch erneutes Anlegen von negativem Potenzial entfernt werden. Ein Abstoßen der Zielmoleküle wird dadurch verhindert, dass eine Waschlösung mit hoher Ionenstärke eingesetzt wird, so dass nur z.B. Kupfer in Form von Cu<sup>2+</sup>-Ionen

entfernt wird, die Ziel-DNA jedoch nicht bewegt wird.

10 Der Vorteil eines auf Metall/Metallionkomplex basierenden Elektrophoreseverfahrens liegt in der geringeren Spannung, die zur Erzeugung des elektrischen Feldes notwendig ist. Sie ist niedriger als die Elektrolysespannung von Wasser, so dass die aggressiven Produkte der Wasserelektrolyse nicht entste-

15 hen können. Damit wird eine Trennung von Elektrolyse- und Elektrophoreseraum unnötig. Trotzdem reicht das erzeugte Feld aus, um die gewünschten Moleküle im Analyten zu transportieren.

20 Kupfer wird bereits heute für Leiterbahnen verwendet und kann künftig als Elektrodenmaterial für Sensoranwendungen bzw. mikrosystemtechnische Anwendungen wie Mikro-Elektrophorese eingesetzt werden. Bei der Herstellung eines solchen Mikro- systems kann daher auf kostengünstige Standardverfahren der 25 Halbleitertechnik zurückgegriffen werden.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen

Figur 1 einen prinzipiellen Aufbau zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Figuren 2 bis 4 Querschnitte unterschiedlich ausgebildeter 35 Anordnungen,

Figur 5a und 5b bei Anordnungen gemäß Figur 3 verfahrensmäßig das Anreichern von Zielmolekülen von geringer zu hoher Konzentration,

Figur 6a und 6b verfahrensmäßig eine Situation gemäß Figur 5b, bei der jedoch auch unspezifische, d.h. nicht-komplementäre Proben-DNA vorliegen, die einer sogenannten Stringenz-Behandlung unterliegen,

Figur 7 den Elektroden-Prozess bei der erfindungsgemäßen Verwendung einer Opferelektrode, sowie eines Komplexbildners,

Figuren 8 bis 10 Draufsichten auf unterschiedliche Messelektroden-Konfigurationen

Figur 11 eine Messanordnung mit nebeneinander angeordneten Messpositionen im Querschnitt und eine aus Einzelpositionen entsprechend der

Figur 12 Figur 8 gebildete Arrayanordnung in der Draufsicht.

Die Figuren werden teilweise gemeinsam beschrieben.

Aus Figur 1 ist der prinzipielle Aufbau einer allgemeinen Anordnung zur Durchführung von biochemischen Messungen ersichtlich. Mit 1 ist ein planares Substrat, z.B. aus Silicium, bezeichnet, auf dem eine dünne Isolatorschicht 2, z.B. aus Siliciumoxid ( $\text{SiO}_2$ ) aufgebracht ist. Auf dieser Anordnung befinden sich zwei Messelektroden 20 und 30, die vorzugsweise aus Edelmetall, insbesondere Gold, bestehen. Die gesamte Messanordnung befindet sich in Kontakt mit einer wässrigen Lösung 15.

In der wässrigen Lösung 15 befinden sich negativ geladene Makro-Moleküle, was in Figur 1 durch die Knäuel-Struktur verdeutlicht wird, und die weiter unten in Figur 5 im Einzelnen mit 200, 200' beziffert sind. Die negativ geladenen Moleküle sollen zu den Messelektroden 20, 30 transportiert werden und werden nachfolgend auch als Zielmoleküle bezeichnet. Im Falle

einer DNA-Analyse sind die Zielmoleküle die zu untersuchende DNA. Über Fängermoleküle, die z.B. in einer Hydrogelschicht 35 immobilisierbar sind, kann die Ziel-DNA zwecks Messung in der Nähe der Elektroden 20, 30 angelagert werden.

5

In der wässrigen Lösung 15 ist weiterhin ein Material vorhanden, das in der wässrigen Lösung beständig und unedler als das Metall der Messelektroden ist. Im allgemeinsten Fall ist das Material eine Metall/Metallion( $Me/Me^+$ )-Kombination, beispielsweise  $Cu/Cu^{2+}$ . Dies bedeutet, dass entsprechend den vorgegebenen Potenzialverhältnissen entweder metallisches Kupfer  $Cu^0$  unter Abgabe von zwei Elektronen aufgelöst wird oder Kupfer(II)-Ionen  $Cu^{2+}$  unter Aufnahme von zwei Elektronen abgeschieden werden können, wobei gilt:

10



Bei der Anordnung gemäß Figur 5 kann bei einer Kupferelektrode als Opfer-Anode 40 durch Anlegen eines positiven Potenzials  $Cu^{2+}$  in Lösung gehen. Dadurch werden dort die negativen Zielmoleküle 200 zur Kupferelektrode 40 bewegt und reichern sich in deren Nähe und damit auch im Bereich der Messelektroden 20, 30 an.

25 Sofern bei Anwesenheit von  $Cu^{2+}$ -Ionen in der wässrigen Lösung an die Messelektroden 20, 30 gemäß Figur 6 ein geeignetes negatives Potenzial angelegt wird, lösen sich diejenigen Fängermolekül/Ziel-DNA-Bindungen, die aufgrund nicht vollständiger Komplementarität eine verminderte Bindungsstärke aufweisen. 30 Dabei werden gleichzeitig Kupfer(II)-Ionen ( $Cu^{2+}$ ) an den Messelektroden zu metallischem Kupfer ( $Cu^0$ ) reduziert.

Anhand der Figuren 5a, 5b einerseits und 6a, 6b andererseits sowie Figur 7 werden die methodischen Prozesse gemäß den in Figur 1 nur prinzipiell aufgezeigten Alternativen verdeutlicht. Speziell in den Figuren 5a bis 6b ist über den Messelektroden 20 und 30, welche Sensoroberflächen 21 und 31 ha-

ben, jeweils eine Hydrogelschicht 35 aufgebracht, in welcher Fänger-Moleküle 100 für Ziel-Moleküle 200, die sich außerhalb der Hydrogelschicht 35 befinden, eingeschlossen sind. Wesentlich ist dabei, dass die Fänger-Moleküle 100 die Ziel-Moleküle 200 einfangen bzw. binden und damit der Analyse an der Sensorfläche 21 bzw. 31 zuführen. Zu dieser Methodik wird beispielsweise auf die ältere Anmeldung PCT/DE 02/01982 der Anmelderin verwiesen.

10 Die Fänger-Moleküle 100 können beispielsweise spezielle thiolmodifizierte Oligonukleotide sein. Ziel-Moleküle 200, die von den Fänger-Molekülen 100 gebunden werden sollen, sind die zu analysierenden DNA's.

15 Im Allgemeinen liegt bei einer bekannten Messanordnung ein Zustand gemäß Figur 5a vor, bei dem die Ziel-DNA nur in geringer Konzentration über der Fänger-DNA vorliegt. Hier ist es schwierig, zu sicheren Messergebnissen zu kommen. Bei einer Anordnung gemäß Figur 5b liegt dagegen die Ziel-DNA in hoher Konzentration über der Fänger-DNA vor, was durch eine 20 DNA-Anreicherung erreicht wird. In diesem Zustand können gute Messergebnisse erzielt werden.

An der Fänger-DNA binden entsprechend der Figur 6a außer der komplementären Ziel-DNA 200 auch nicht vollständig komplementäre DNA-Fragmente 200'. Durch eine Stringenz-Behandlung lässt sich unspezifisch gebundene DNA durch Beaufschlagen der Elektroden mit jeweils geeigneten Potentialen selektiv entfernen. Die unspezifisch gebundene DNA wird dann aufgrund ihrer schwächeren Bindungskräfte abgestoßen.

Aus der Figur 1 sowie den Teilfiguren 5a und 5b ist ersichtlich, dass durch Anlegen spezifischer Potenziale an die Hilfselektrode 40 eine gewünschte Anreicherung der Ziel-DNA erreicht wird. Im Einzelnen wird dazu eine Hilfselektrode 40 aus unedlem Metall, beispielsweise Kupfer, gewählt und an die Hilfselektrode 40 ein positives Potential angelegt. Sofern

sich die gesamte Anordnung in einer wässrigen Lösung befindet, gehen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Lösung. Dadurch entsteht ein Feldgradient und die negativ geladenen DNA-Moleküle werden angezogen.

5

Letzterer Prozess wird im Wesentlichen durch Figur 7 verdeutlicht. Insbesondere ist hier ersichtlich, dass das in Lösung gebrachte Kupfer-Ion komplexiert wird, wozu Histidin-Moleküle 70 verwendet werden.

10

Aus der Figur 1 sowie den Teilfiguren 6a und 6b ist ersichtlich, dass durch Anlegen spezifischer Potenziale an die Messelektroden 20 30 und Hilfselektroden 40, 45 eine gewünschte Selektion der DNA erreicht wird. Im Einzelnen werden die 15 Messelektroden negativ, die Hilfselektroden positiv polarisiert. Sofern sich die gesamte Anordnung in einer wässrigen Lösung befindet, die Kupfer(II)-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) enthält, werden diese auf den Messelektroden 20,30 zu metallischem Kupfer ( $\text{Cu}^0$ ) reduziert. Dadurch entsteht ein Feldgradient und die 20 negativ geladene, nicht vollständig komplementäre DNA wird abgestoßen.

Beide Alternativen können separat oder aber kombiniert ablaufen. Zunächst werden Zielmoleküle angereichert und dann selektiert, Es kann aber auch nur eine Selektion vorgenommen werden.

In den Figuren 2 bis 4 sind unterschiedliche Varianten von Sensoranordnungen dargestellt. In Figur 2 haben die aus Gold gebildeten Messelektroden 20, 30 freie Gold-Sensorflächen 21, 31, an die die Fänger-DNA 100 gebunden sind. Alternativ ist in Figur 3 ein Hydrogel 35 vorhanden, welches Fänger-DNA 100 enthält. Speziell in Figur 4 ist eine Anordnung dargestellt, bei der neben den eigentlichen Messelektroden 20 und 30 weiterhin eine freie Reaktionsfläche 50 aus Gold vorhanden ist, an welcher die Fänger-DNA 100 in einer dichten Anordnung gebunden sind. Dies hat den Vorteil einer großen Dichte von

Fänger-DNA. Allerdings müssen bei der Herstellung der Reaktionsfläche 50 zunächst die Messelektroden 20, 30 durch Kupfer oder dergleichen abgedeckt werden, um dort eine Anlagerung der Fänger-DNA 100 zu verhindern. In Figur 4 sind dafür Kupfer-Schichten 22 bzw. 32 vorhanden. Bei allen Anordnungen gemäß den Figuren 2 bis 4 ist jeweils die Opferelektrode 40 in der Nähe der Messelektroden 20 und 30 angeordnet, um durch das Inlösungsgehen von Kupfer den Feldgradienten aufzubauen und damit die Anreicherung der Ziel-DNA 200 in der Nähe der Messelektroden 20 und 30 zu bewirken. Im Ergebnis kann somit die Messgenauigkeit erheblich verbessert werden.

In den Figuren 8 bis 10 sind die verschiedene Varianten von Messsensoren gemäß den Figuren 2 bis 4 in der Draufsicht dargestellt. Speziell in Figur 8 ist ein Messsensor 80 vorhanden, der aus zwei Kammelektroden 82 und 83 mit ineinander greifenden Elektrodenfingern besteht, wobei eine einzige Opferelektrode 84 ringartig um die Kammelektroden angeordnet sind.

20

Entsprechendes ergibt sich aus Figur 9, wobei hier der Bereich der Kammelektroden mit der Hydrogelschicht 85 abgedeckt ist. Eine derartige Hydrogelschicht kann sich über der gesamten Messanordnung befinden. Speziell in Figur 10 sind zusätzlich noch Reaktionsflächen 86 zum Anlagern von Fänger molekülen vorhanden.

Aus den Einzelsensoren gemäß den Figuren 8 bis 10 können Arrays konzipiert werden, die n-Zeilen und m-Spalten haben. Aus den Figuren 11 und 12 ist eine Komplettanordnung mit einer Vielzahl von Messsensoren 80, 80', ... die das n·m-Array darstellen. Dabei ist es prinzipiell möglich, das Array mit Einzelpositionen entsprechend einer der Figuren 8 bis 10 aufzubauen, bei der jede Einzelposition eine ringartige Kupfer-Opferanode 84 hat. Um die gesamte m·n-Anordnung mit den Einzelpositionen ist dabei als weiterer Ring die Hilfselektrode 185 angeordnet.

11.

Gemäß Figur 11 befindet sich die Komplettanordnung 180 in einem Behälter, z.B. einem Durchflusskanal 150, mit einem Deckel 120, einem Zufluss 121 und einem Abfluss 122.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Transport elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen zwei Mess-elektroden, gekennzeichnet durch folgende Maßnahmen:

- in der Nähe der Messelektroden wird ein metallisches Material, das im wässrigen Elektrolyten beständig und unedler als das der Messelektrode ist, als potenzialbeaufschlagbare Elektrode angeordnet,
- durch Anlegen eines positiven Potenzials an die Elektrode wird das metallische Material als positiv Ionen in Lösung gebracht,
- wodurch negativ geladene Moleküle als Zielmoleküle in die entgegengesetzte Richtung transportiert und an den Mess-elektroden angereichert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die in Lösung gehende Metallionen durch die Anwesenheit eines Komplexbildners komplexiert werden, wodurch ihre Konzentration gering und nahezu konstant gehalten wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als metallisches Material Kupfer verwendet wird, welches eine Kupfer-Opfer-Anode bildet.

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Komplexbildner zur Komplexierung des Kupfer-Ions Histidin verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zum Detektieren der Zielmoleküle Fänger moleküle an einer Elektrodenoberfläche verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Fängermoleküle thiolmodifizierte Fängermoleküle verwendet werden.

5

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Fängermoleküle hydrogelgebundene Fängermoleküle verwendet werden.

10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Elektrophoreseverfahren ausgeführt wird.

15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass eine DNA-Analyse von DNA-Fragmenten erfolgt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass bei der DNA-Analyse die angereicherten Moleküle als Zielmoleküle detektiert werden.

25 11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass durch Polarisation der für die Elektrophorese bzw. DNA-Analyse verwendeten Elektroden die Selektivität des Prozesses erhöht wird.

30 12. Verfahren zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen zwei Messelektroden, gekennzeichnet durch folgende Maßnahmen:

- in der wässrigen Lösung befinden sich Metallionen
- durch Anlegen eines negativen Potenzials an die Messelektroden wird das Metallion an den Messelektroden als Metall abgeschieden,
- wodurch negativ geladene, in der Nähe der Messelektroden gebundene Moleküle als Zielmoleküle mit einer hinreichend

niedrigen Bindungsenergie von den Messelektroden wegtransportiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Metallionen Kupfer und als Messelektroden Gold verwendet werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die von den Messelektroden wegtransportierten Moleküle solche Zielmoleküle sind, die bei 10 der DNA-Analyse nicht detektiert werden sollen.

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 10 bzw. zur Durchführung des 15 Verfahrens nach Anspruch 12 oder einem der Ansprüche 13, 14, mit einer Anordnung aus Mess-Elektroden (20, 30) zur elektro-chemischen Messung in einer wässrigen Lösung (15), wobei in der wässrigen Lösung Metallionen bzw. Häufungen (40) von Metall aus unedlerem Material als das der Messelektroden (20, 20, 30), wobei das Material in wässriger Lösung (15) beständig ist, vorhanden sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Messelektroden (20, 30) 25 aus Edelmetall, insbesondere Gold, bestehen.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Metall Kupfer ist und eine Opferelektrode (40) bildet.

30 18. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Messelektroden aus Gold eine Sensoroberfläche (21, 31) aufweisen, an der Fänger- 35 moleküle für die Ziel-DNA (200) gebunden sind.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15, 16 oder 18 dadurch gekennzeichnet, dass die

Messelektroden (20, 30) eine Interdigitalstruktur aus Kammelektroden (82, 83) mit ineinander greifenden Elektrodenfingern bilden.

- 5 20. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Operelektrode (84) ringartig um die Kammelektroden (82, 83) angeordnet ist.
- 10 21. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass auf den Messelektroden (20, 30) eine Hydrogelschicht (35) zum Binden der Fänger moleküle (100) angeordnet ist.
- 15 22. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass den Messelektroden (20, 30) separate Reaktionsflächen (50) zum Anlagern der Fänger moleküle (100) zugeordnet ist.
- 20 23. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass von einzelnen Interdigitalstrukturen (80, 80', ...) mit Operelektrode (84) ein Array (80) mit m Zeilen und n Spalten gebildet ist.
- 25 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hilfselektrode (185) zu den einzelnen Operelektroden (84) ringartig um das m·n-Array (180) verläuft.

1/5

FIG 1

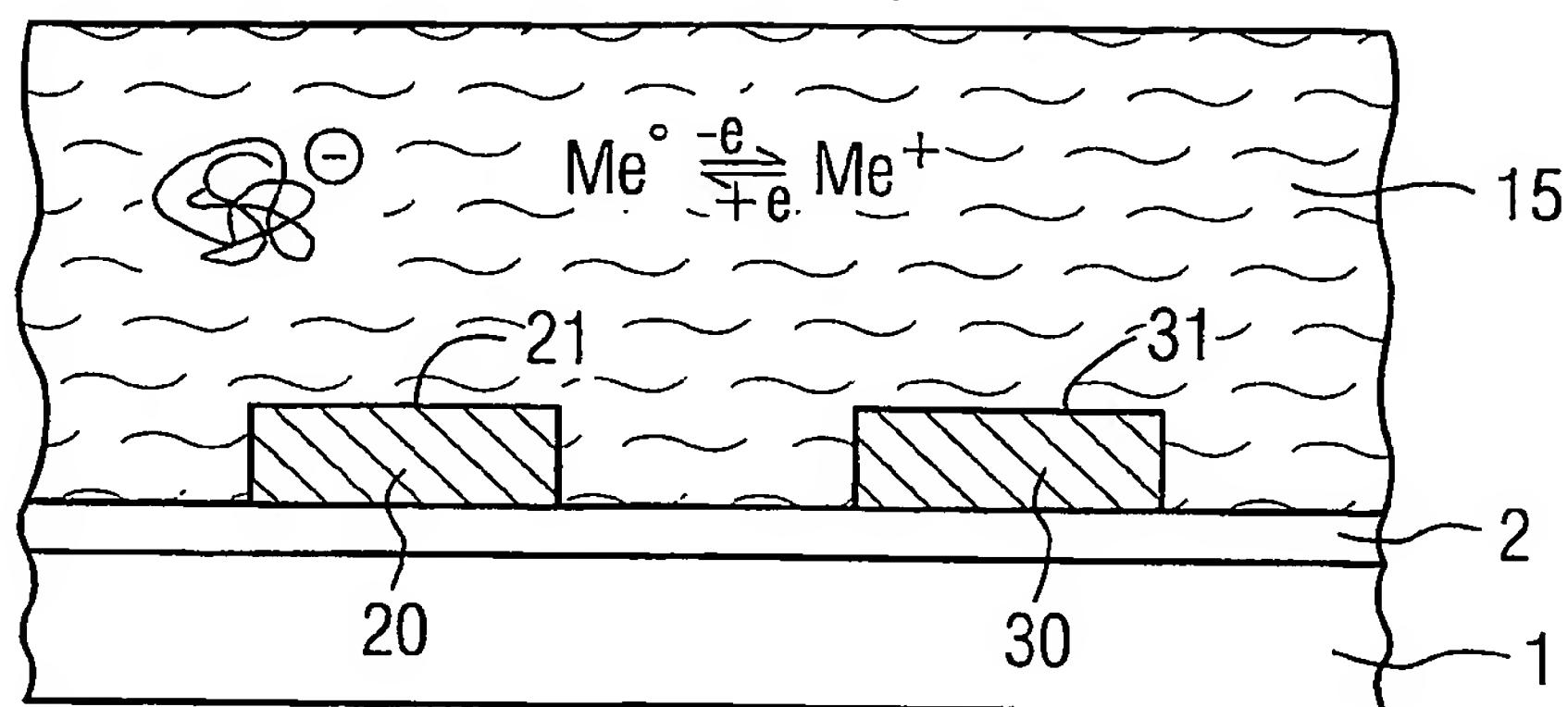


FIG 2

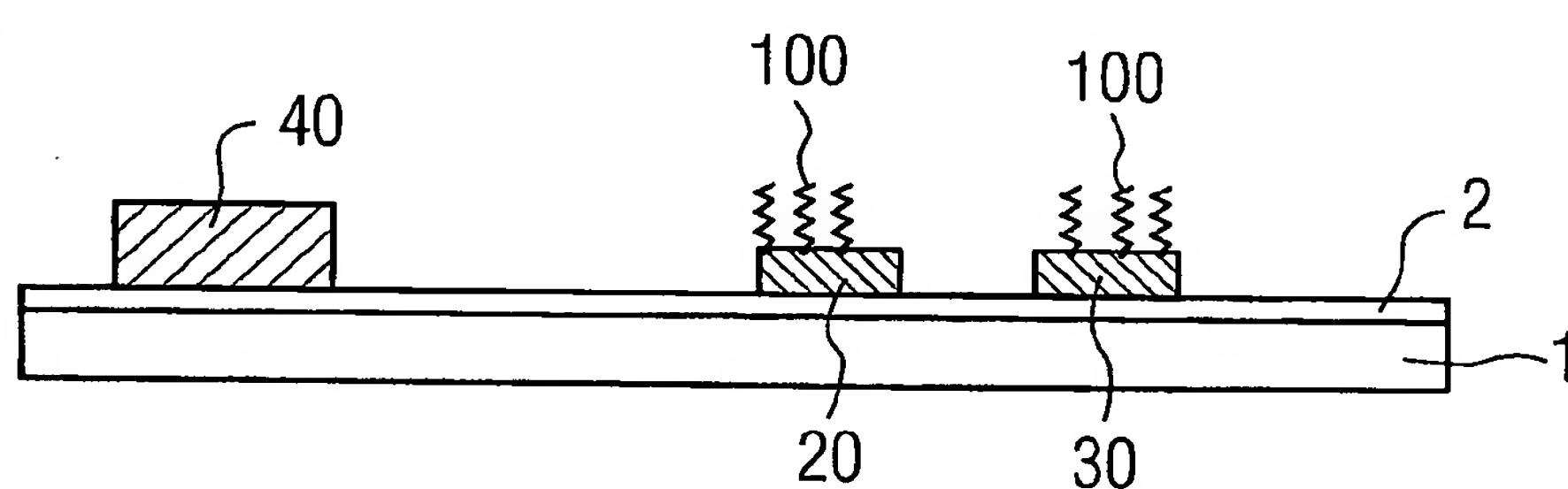


FIG 3

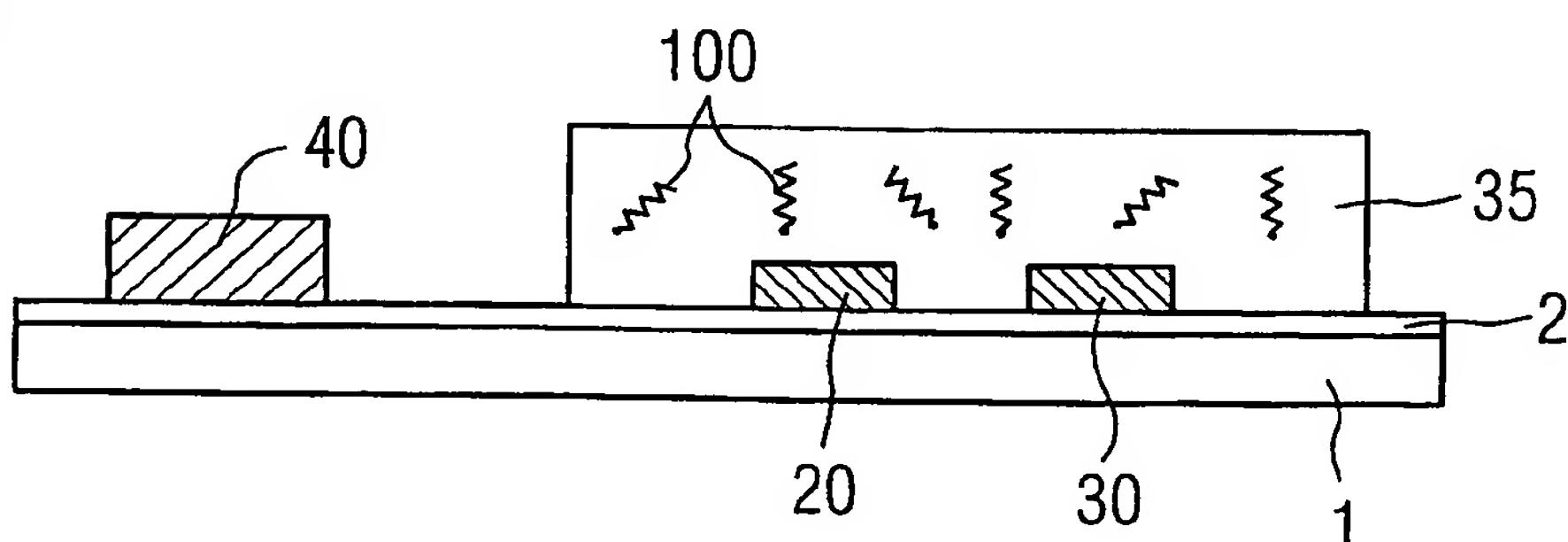
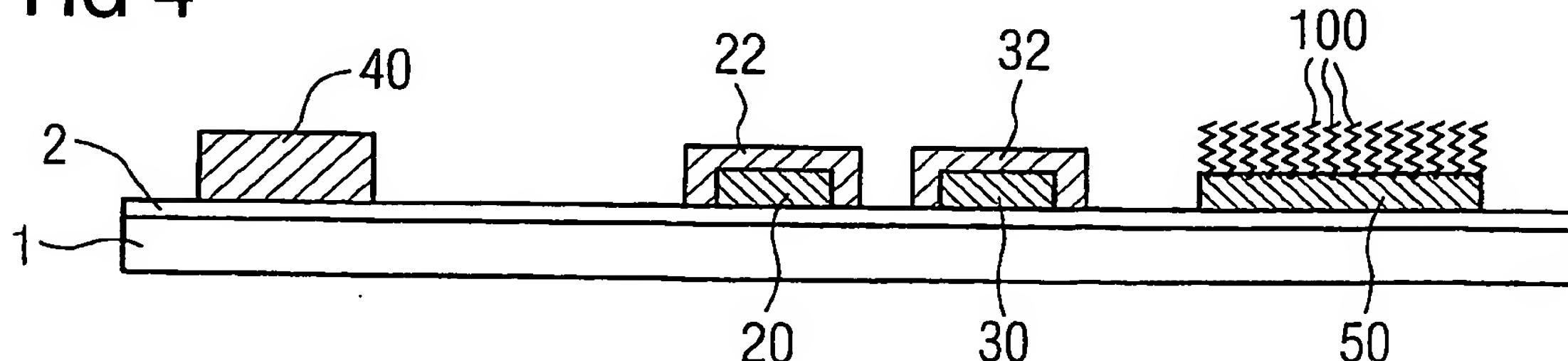


FIG 4



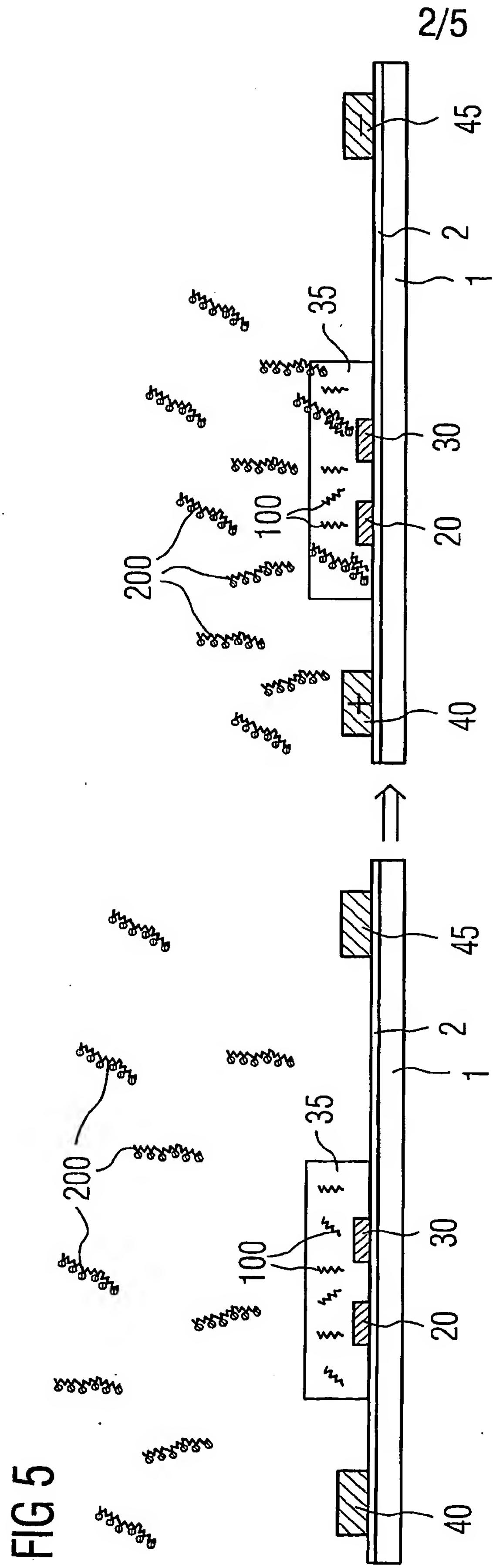


FIG 5

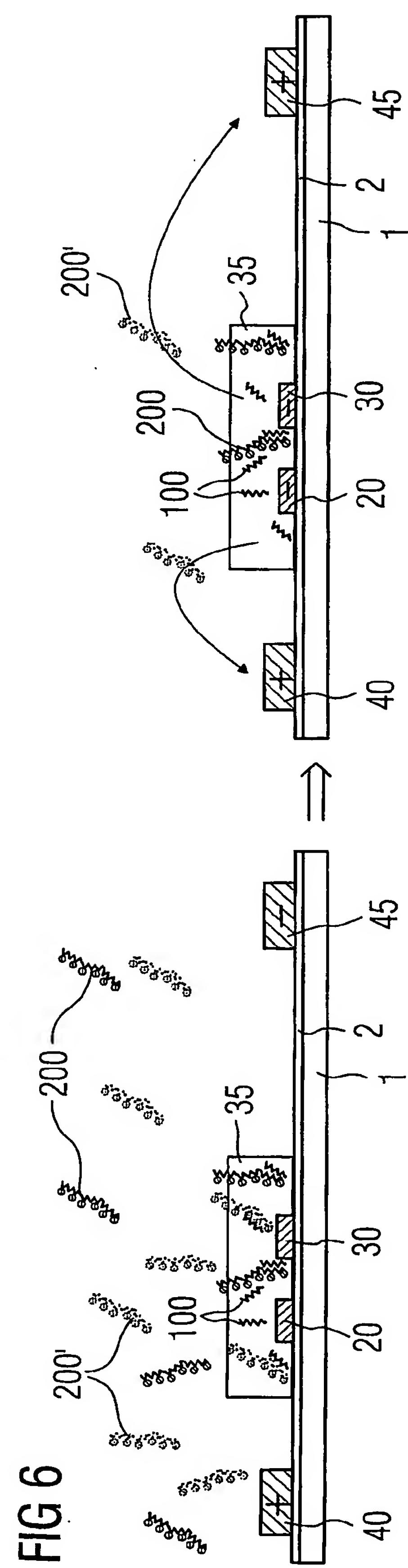


FIG 6

3/5

FIG 7

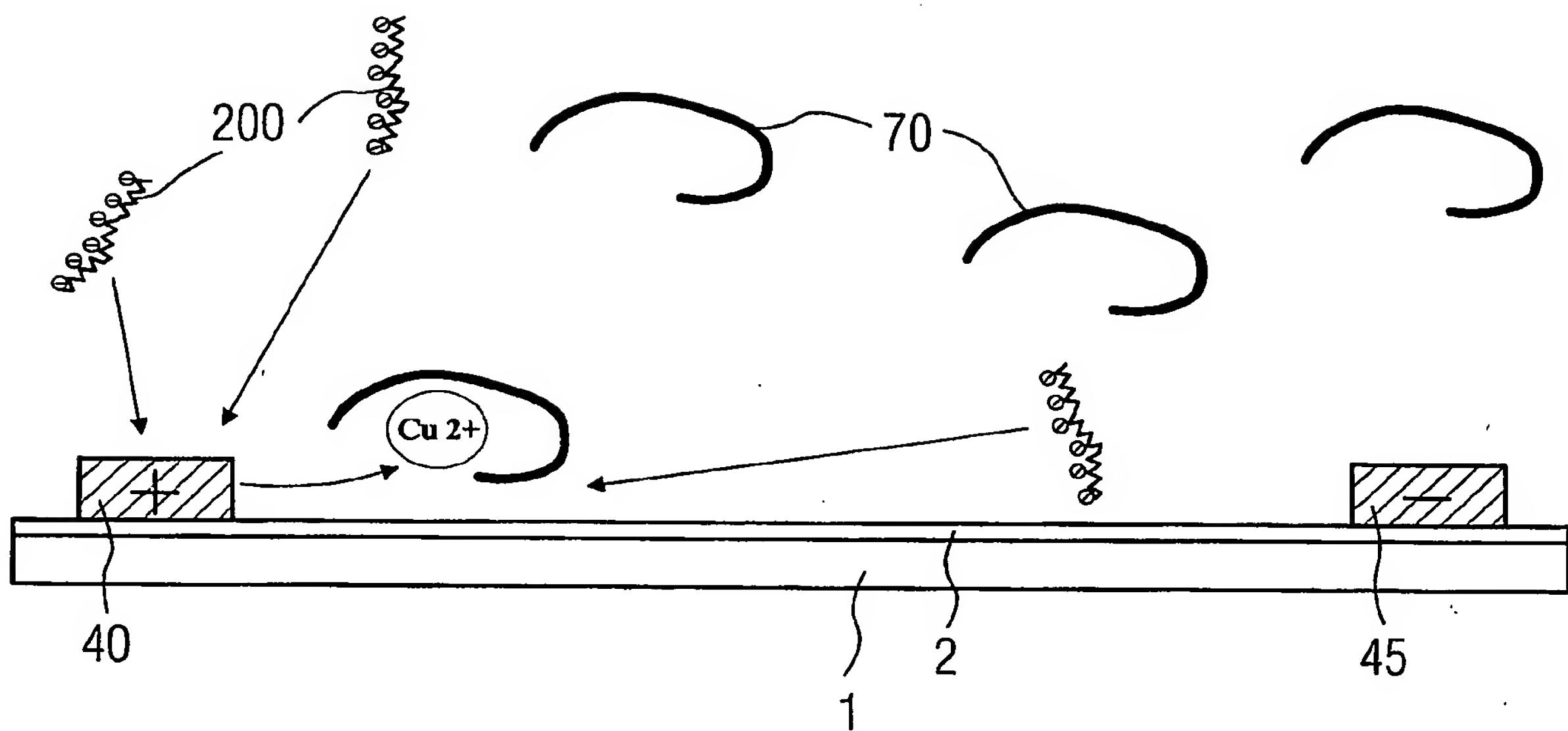


FIG 8

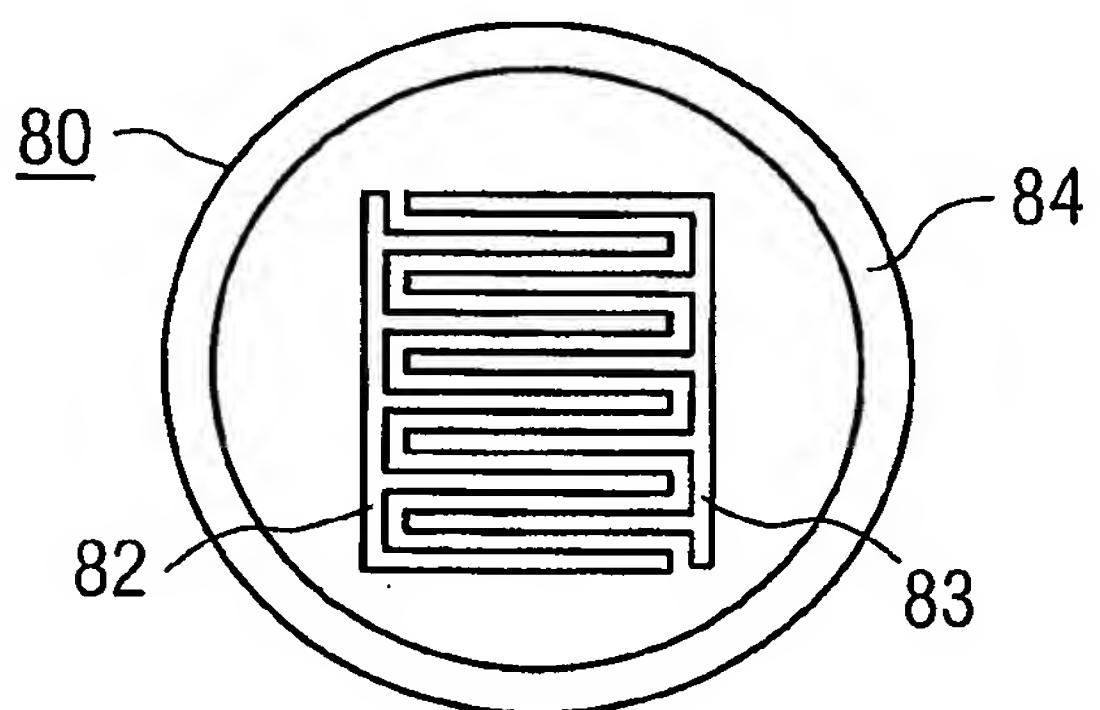
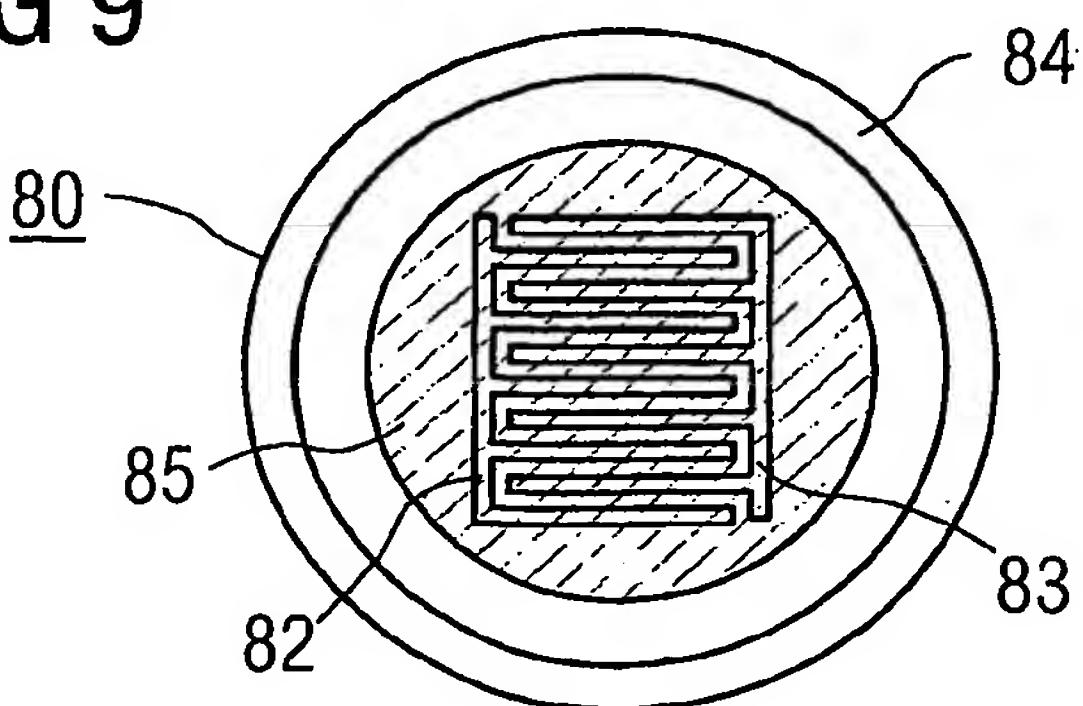


FIG 9



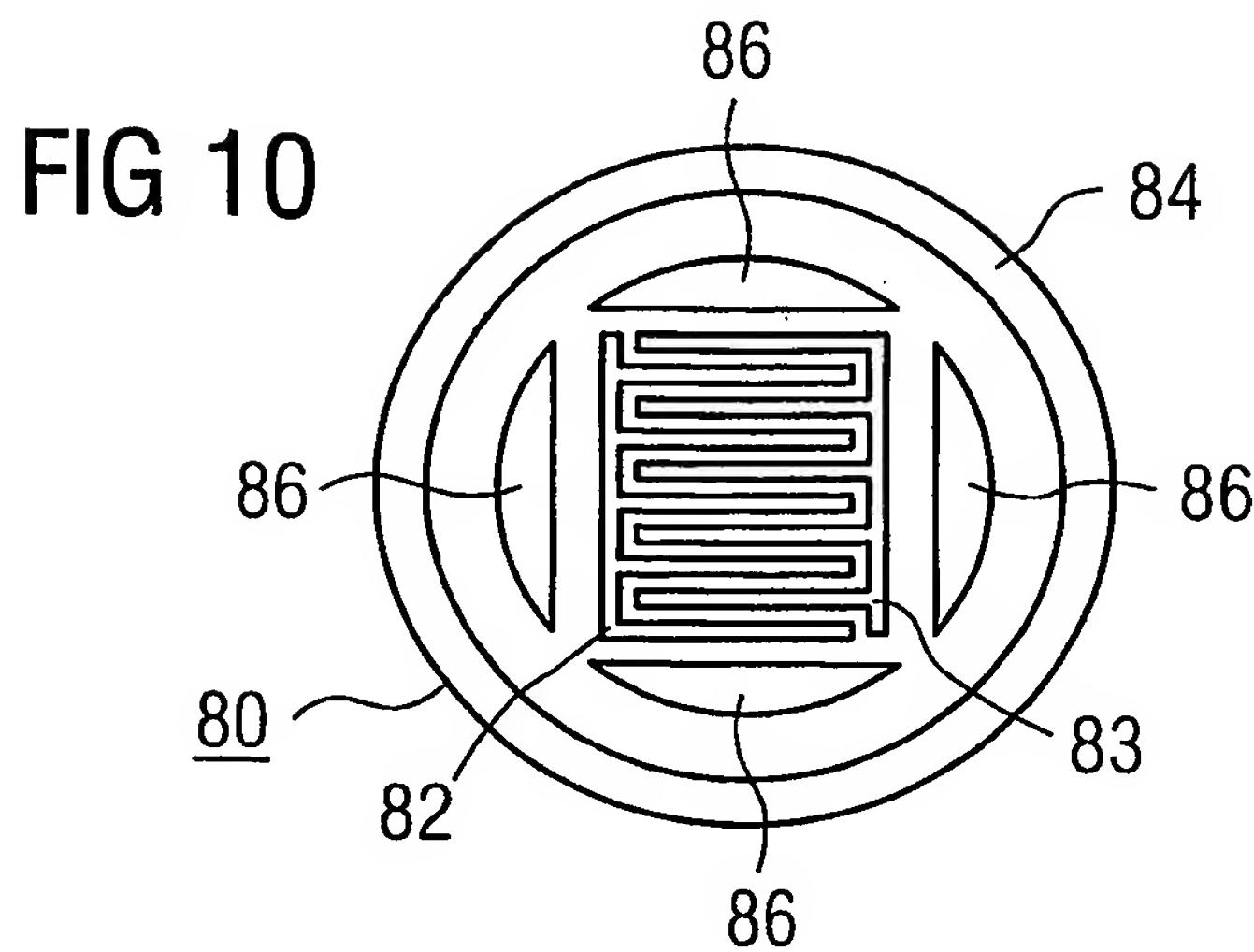
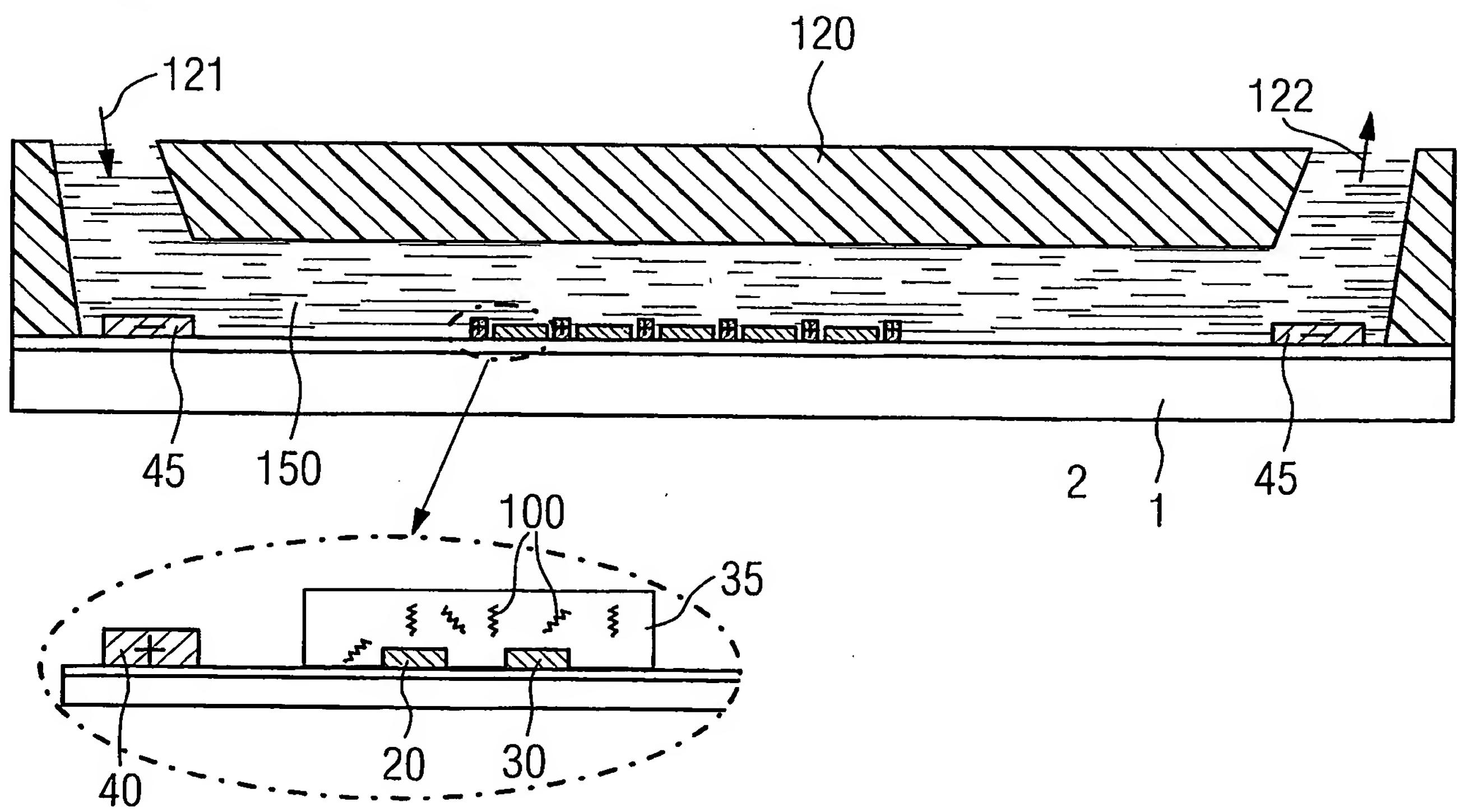
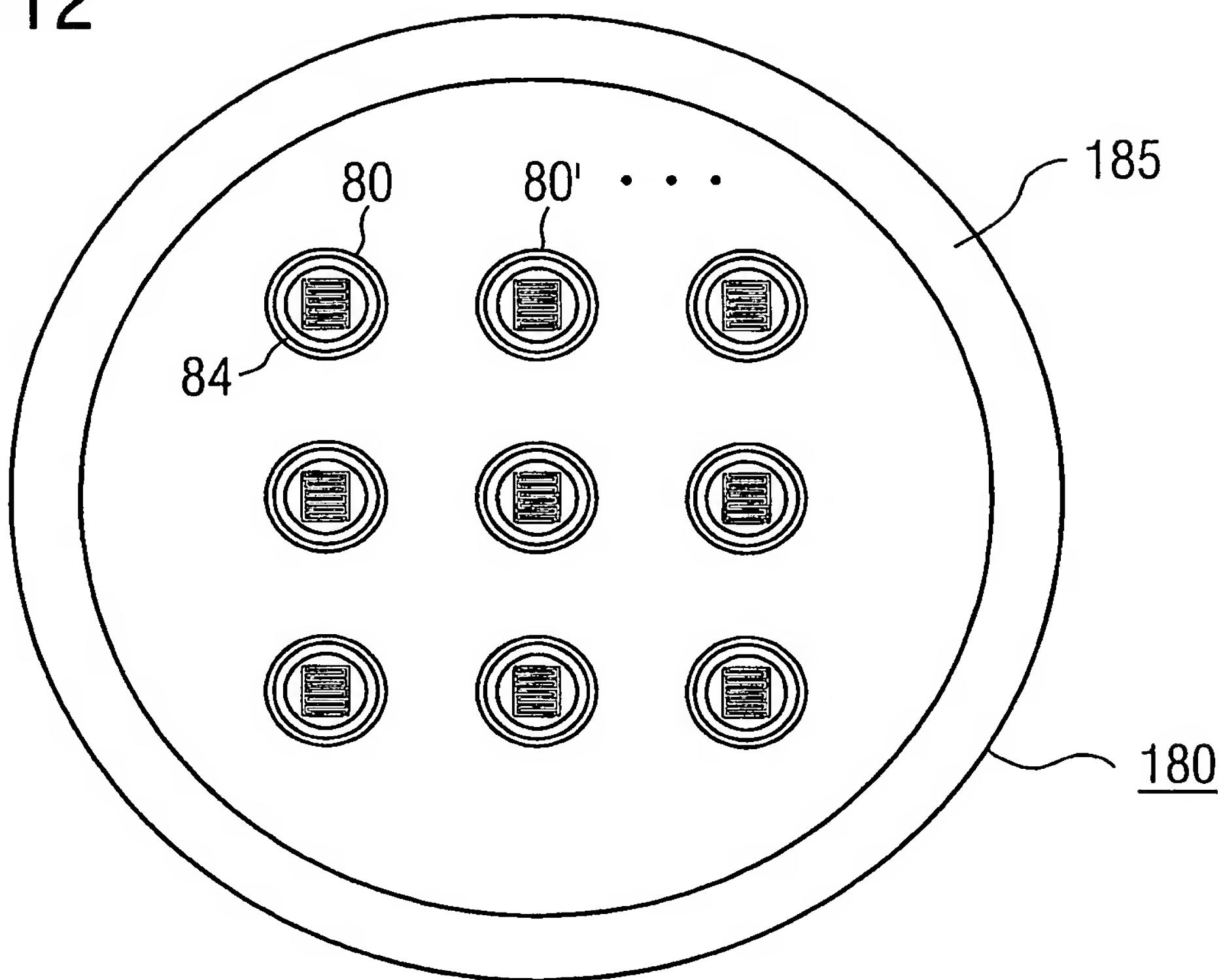
**FIG 11**

FIG 12



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/543 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/063041 A (MITOCON LTD) 15 August 2002 (2002-08-15) the whole document -----	1,12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- °A° document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- °E° earlier document but published on or after the International filing date
- °L° document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- °O° document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- °P° document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- °T° later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the Invention
- °X° document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- °Y° document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- °&° document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

22 April 2004

Date of mailing of the International search report

03/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02063041	A 15-08-2002	KR 2002065241 A	13-08-2002
		WO 02063041 A1	15-08-2002
		US 2003039975 A1	27-02-2003

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03938

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/543 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/063041 A (MITOCON LTD) 15. August 2002 (2002-08-15) das ganze Dokument -----	1,12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P' Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

22. April 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

03/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

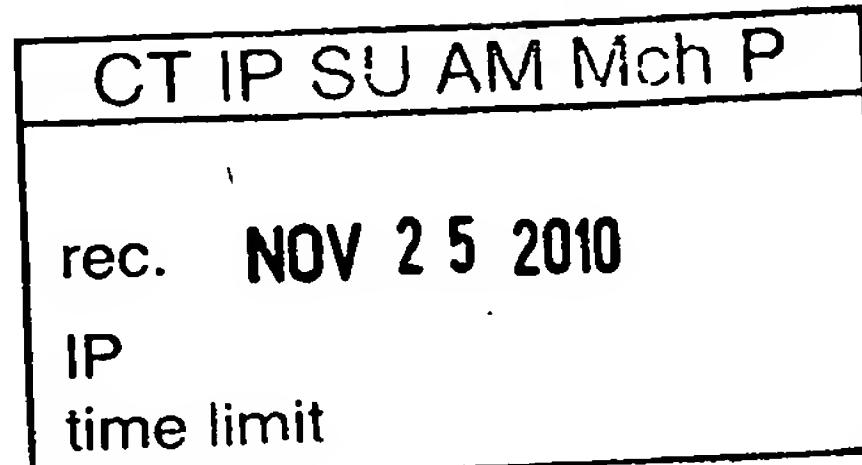
Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03938

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02063041	A 15-08-2002	KR 2002065241 A	13-08-2002
		WO 02063041 A1	15-08-2002
		US 2003039975 A1	27-02-2003



SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT  
Patent Department  
Postfach 22 16 34  
80506 München  
ALLEMAGNE



Formalsachbearbeiter  
Name: Müller, Ka-Bo  
Tel.: +49 89 2399 - 2395  
oder alternativ:  
+31 (0)70 340 45 00

Sachprüfer  
Name: Komenda, Peter  
Tel.: +49 89 2399 - 2777

Anmeldung Nr. 03 795 750.3 - 2204	Zeichen 2002P11389WE	Datum 24.11.2010
Anmelder SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT		

### Mitteilung gemäß Artikel 94 (3) EPÜ

Die Prüfung der obengenannten Anmeldung hat ergeben, dass sie den Erfordernissen des Europäischen Patentübereinkommens aus den beigefügten Gründen nicht genügt. Werden die genannten Mängel nicht behoben, so kann die Anmeldung nach Artikel 97 (2) EPÜ zurückgewiesen werden.

Sie werden aufgefordert, innerhalb einer Frist

von 4 Monaten

gerechnet von der Zustellung dieses Bescheides, Ihre Stellungnahme einzureichen und die angeführten Mängel, soweit diese behebbar sind, zu beseitigen. Die Frist berechnet sich nach den Bestimmungen der Regeln 126 (2), 131 (2) und (4) EPÜ. Änderungen zur Beschreibung, zu den Ansprüchen und den Zeichnungen sind gegebenenfalls innerhalb der genannten Frist in **einem Exemplar** auf gesonderten Blättern (R. 50 (1) EPÜ) einzureichen.

Wenn Sie Änderungen einreichen, müssen Sie diese kennzeichnen und ihre Grundlage in der Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung angeben. Wird eines dieser Erfordernisse nicht erfüllt, kann dies zu einer Mitteilung der Prüfungsabteilung führen, in der Sie zur Beseitigung dieses Mangels aufgefordert werden (R. 137 (4) EPÜ).

**Unterlassen Sie es, auf diese Aufforderung rechtzeitig zu antworten, so gilt die europäische Anmeldung als zurückgenommen (Art. 94 (4) EPÜ).**



**Komenda, Peter  
Beauftragter Prüfer  
Für die Prüfungsabteilung**

Anlagen: 1 Seite/n Gründe (Form 2906)  
WO 2007/051275

Der Prüfung werden folgende Anmeldungsunterlagen zugrunde gelegt:

**Beschreibung, Seiten**

1-14 veröffentlichte Fassung

**Ansprüche, Nr.**

1-12 veröffentlichte Fassung

**Zeichnungen, Blätter**

1/7-7/7 veröffentlichte Fassung

1 Für die vorliegende Anmeldung wurde bereits ein internationaler vorläufiger Prüfungsbericht nach dem PCT erstellt. Die darin genannten Mängel werden auch nach den entsprechenden Bestimmungen des EPÜ beanstandet.

2 Darüberhinaus ist folgendes zu bemerken:

Die am 17.06.2004 veröffentlichte Anmeldung WO 2004051275 beansprucht die Priorität vom 02.12.2002. Ihr Inhalt in der ursprünglich eingereichten Fassung gilt daher gemäß Artikel 54 (3) und (4) EPÜ 1973 als Stand der Technik, der bei der Prüfung auf Neuheit zu berücksichtigen ist.

Diese ältere Anmeldung zeigt einen DNA-Chip der unter den Wortlaut des unabhängigen Anspruchs 1 fällt (siehe Figur 6 und entsprechende Beschreibung).

Somit steht sie dem Gegenstand zumindest des Anspruchs 1 der vorliegenden Anmeldung insofern neuheitsschädlich entgegen, als dieselben Vertragsstaaten in beiden Anmeldungen benannt worden sind.